



Studies on Pathogenesis of Mitochondrial DNA with a Deletion in Mice

著者	堅田 俊
その他のタイトル	マウス欠失突然変異型ミトコンドリアDNAの病原性発揮に関する基礎研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102甲第6903号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00122457

氏名（本籍）	堅田 俊 （ 埼玉県 ）		
学位の種類	博 士 （ 理学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6903 号		
学位授与年月日	平成26年 3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Pathogenesis of Mitochondrial DNA with a Deletion in Mice (マウス欠失突然変異型ミトコンドリア DNA の病原性発揮に関する基礎研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治

論 文 の 要 旨

ミトコンドリアはATP産生を担う細胞小器官であり、独自のゲノムであるミトコンドリアDNA (mtDNA)を複数コピー（数百～数千コピー／細胞）有している。哺乳類のmtDNAにはATP産生に必要な13種類の呼吸酵素複合体サブユニット遺伝子とそれらの翻訳に必要な22種類のtRNA、2種類のrRNAがコードされている。ミトコンドリアは α プロテオバクテリアが起源とされ、その細胞内共生・進化の過程で遺伝子の大部分を核ゲノムに移行させたと考えられている。そのため、呼吸酵素複合体の多くのサブユニットは核ゲノムにコードされている。つまり、ミトコンドリアの主な機能であるATP産生はミトコンドリアと核の両方のゲノムに制御されていることになる。近年、mtDNAの突然変異がミトコンドリア病、糖尿病、神経変性疾患など多様な疾患の原因になることが報告されている。例えば、欠失突然変異型mtDNA（欠失型mtDNA）分子種は、造血不全を主徴とするPears on症候群（PS）、網膜色素変性を主徴とするKearns-Sayre 症候群（KSS）、進行性外眼筋麻痺など、複数の病型との関与が示唆されている。しかしながら、ミトコンドリア機能は核ゲノムによっても制御されているため、複数の病型に同一の欠失型mtDNA分子種が散見されたことだけを根拠に、欠失型mtDNA分子種が複数の病型誘導の原因になるとは結論できない。つまり、欠失型mtDNAが複数の病型を誘導しうる病原性を有するか否かは明らかにされていない。そこで本研究では、核背景はC57BL/6 (B6) で欠失型mtDNAを含有するミトコンドリア病モデルマウス（ミトマウス Δ ）を活用して、欠失型mtDNA分子が単一の核背景で複数の病型を誘導できるのか否かを解析した。

ミトマウス Δ は8ヶ月齢にてKSS様症状を示すことが先行研究により明らかとなっている。ヒトの症例ではKSSは若年性疾患で、PSは乳幼児性疾患であることを鑑み、ミトマウス Δ がPSの病型を発症する場合、出生前後期であろうと想定し、ミトマウス Δ の大規模コロニーを構築し詳細な解析を行った。その結果、欠失型mtDNAの含有率1%～49%のミトマウス Δ （Lowグループ、n = 50）は対照群と同等の生存率を示したが、 Δ mtDNAの含有率50%～70%のミトマウス Δ （Highグループ、n = 70）はおよそ半数の個体が出生後一ヶ月以内に死亡することが判明した（ $P < 0.05$ ）。Highグループの産仔は高率に欠失型mtDNAを含有する母マウスから出生するため、上記の結果は母マウスが有する欠失型mtDNAの病原性に起因する可能性が考えられた。欠失型mtDNAは時間に伴い各臓器で蓄積する一方、卵では消失することが先行研究により明らかになっている。よって、母マウス自体に原因があるならば、母マウスの週齢に伴って死亡する出生個体数は増加すると考えられる。そこで、母マウスが仔を出産した時の週齢と出生個体の生存率との相関を観察した。その結果、週齢の高い母マウスの産仔ほど生存率が高いことが明らかとなった（ $P < 0.05$ ）。このことから、今回観察された出生後致死は、母マウスで

はなく、その産仔自体が含有する欠失型mtDNAに起因するものであると結論できる。

次に、ミトマウスΔが乳幼児期にPS様症状、すなわち造血不全や鉄代謝異常を示すか否か、出生前日の胚（18.5日胚）を用いて解析した。その結果、Highグループすなわち出生後その多くが死に至る集団において、低体重（ $P < 0.05$ ）、造血異常（貧血の指標である網状赤血球の割合増加、 $P < 0.05$ ）、鉄代謝異常（肝臓における鉄沈着）が観察された。これらのことから、単一の欠失型mtDNA分子種がPS様の症状を誘導する病原性を有することが明らかとなった。

細胞内の個々のミトコンドリアは分裂・融合を繰り返すことで内容物を交換することができる。このため、mtDNAに何らかの突然変異が生じてこのような分子種がある一定以上蓄積しない限り病原性を発揮することができない。先行研究では、欠失型mtDNAがミトコンドリア呼吸機能異常という病原性を発揮するには、組織や細胞に80%以上蓄積することが必要であることを報告している。これは、欠失型mtDNAが欠失突然変異によって失った遺伝子産物が野生型mtDNAから供給されることによりミトコンドリアのエネルギー産生能が正常化されることに起因する（ミトコンドリア間相互作用）。このため、欠失型mtDNAの蓄積が80%以下の細胞では全てのミトコンドリアが正常に、逆に欠失型mtDNAの蓄積が80%以上の細胞では全てのミトコンドリアが異常になることが分かっている。一方、本研究では欠失型mtDNAを50%以上含有する18.5日胚の肝臓で病態が発症（50%という比較的低い含有率で病原性が発揮）されたため、その理由を精査する必要がある。そこで、ミトコンドリアの呼吸機能を電子顕微鏡により解析したところ、Highグループの肝臓において、構造と機能が正常に近いミトコンドリアと両者が明らかに異常なミトコンドリアが単一の肝細胞ならびに造血細胞に存在していることが判明した。この結果は、胚時期の肝細胞や造血細胞ではミトコンドリア間相互作用が作動せず、結果として欠失型mtDNAの含有率が50%程度であっても病原性が発揮されてしまうことを示唆している。

出生時に欠失型mtDNAを50%以上含有する個体のおよそ半数は生後1ヶ月以内に死亡してしまうが、半数は生存する。この生存個体を精査した結果、生後1ヶ月齢までに造血異常と肝臓における鉄代謝異常を主徴とするPS様症状が緩解した。この緩解状態にある各種臓器の欠失型mtDNAの含有率の変動をReal-time PCR法で追跡した結果、PS様症状の罹患臓器である血液と肝臓サンプル中の欠失型mtDNAの含有率が低下することが分かった。そのうえ、このような出生時に欠失型mtDNAを50%以上含有し、造血系の病態を緩解、生存した個体であっても、各臓器の欠失型mtDNAの含有率が増加に転じ、おおよそ欠失型mtDNAの含有率が80%を超えると、それらの臓器にミトコンドリアエネルギー代謝異常が誘導され、典型的なKSSに類似する多様な病態（高乳酸血症、網膜異常、心伝導障害、腎障害など）を呈することが分かった。

総じて、本研究の遂行により、単一の欠失型mtDNA分子種が単一の核背景のマウス個体の発生・成長過程において乳幼児期におけるPS様症状と若年期におけるKSS様症状の少なくともこれら2つの病型を誘導できることが明らかとなった。そして、このような複雑な病態誘導の制御基盤は罹患臓器におけるmtDNAの蓄積に対する感受性と欠失型mtDNAの含有率の変化にある可能性が提案された。

審 査 の 要 旨

本論文では、欠失突然変異型（欠失型）mtDNA分子種を導入したモデルマウスを活用して、欠失型mtDNA分子種が乳幼児期と若年期にそれぞれ異なる病型を誘導することを証明し、さらに、その分子基盤として、臓器間の欠失型mtDNA分子の蓄積動態の差異、ならびに、臓器間におけるミトコンドリアの分裂・融合による遺伝子産物の交換能力の差異による病原性制御機構の存在を提案している。突然変異型mtDNA分子種がミトコンドリア病をはじめ、糖尿病、がん、神経変性疾患など多様な病態の原因になる可能性が示唆されている現在、本論文はミトコンドリアの機能破綻による影響を類推するための基礎的な知見を提供しており、高く評価できる。特に、欠失型mtDNA分子種による多様な病態誘導を担保する病原性の立証とその機構解明を行った成果は、分子細胞生物学領域の研究として独創性に秀でている。

平成26年2月3日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。